

ZÁRÓJELENTÉS OTKA 48410

Ifjúsági OTKA pályázatomban eredetileg 2005 januárjától 2008 decemberig volt érvényes, de külföldi tanulmányutamban miatt a kezdési időpontra halasztási kérelmet nyújtottam be, melyet 2005. október 1.-re módosítottak. A pályázati pénz 2006-tól volt felhasználható.

2009 novemberében kért halasztási kérelmem egyik oka volt, hogy 2007 novembere és 2008 novembere között szülési szabadságon, illetve GYED-en voltam, bár a kutatási munka ez idő alatt is folyamatos volt, azonban nem tudtam az arra az időszakra tervezett összes kísérletet elvégezni. Halasztási kérelmem másik oka volt, hogy a 2009-es év első felében a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében átszervezések történtek, melyek a kutatás szakmai és személyi feltételeit módosították, ami szintén idővesztést okozott.

2010 szeptemberében a záró beszámoló elkészítéséhez egy hónap halasztást kértem és kaptam, mert 2010 májusában megszületett második gyermekem.

Szakmai rész

A *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatív nem-fermentáló baktérium, az egyik leggyakrabban izolált opportunistá patogén kórházi beteganyagban. *P. aeruginosa* jelentős szerepet játszik immunszupresszált betegek fertőzéseiben, elsősorban neutropéniás, lázas betegek fertőzéseiben, gyakran kerül izolálásra égési sebek fertőzései során, illetve az egyik leggyakrabban előforduló kórokozó intenzív osztályokon ventilátor-asszociált pneumóniákban. A *P. aeruginosa* jelentős intrinszc rezisztenciával rendelkezik az antibiotikumokkal szemben ellen. Így az antipseudomonas β -laktámoknak, mint a ticarcillin, a piperacillin, a ceftazidim, a cefepim, az aztreonam és a karbapenemeknek jelentős terápiás értékük van. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia alapja: β -laktamáz enzimek termelése, a külső membránfehérjék megváltozása és az efflux-pumpák számának növekedése. A legtöbb *P. aeruginosa* törzs rezisztens a harmadik generációs cefalosporinokra, a kromoszómálisan kódolt β -laktamáz, az AmpC enzim termelése miatt. Kiterjedt-spektrumú β -laktamáz enzimeket ritkán izolálnak *P. aeruginosa* törzsekből. Azonban a mobil genetikai elemek – integronok, transzpozonok - által kódolt szerzett β -laktamázok, elsősorban a metallo- β -laktamáz enzimek (MBL) jelentős rezisztencia-mechanizmust jelentenek a *P. aeruginosa* törzsekben.

A *P. aeruginosa* törzsek rezisztencia mechanizmusairól készült összefoglaló cikk:

Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 1;43:S49-56, 2006. IF: 6,186

1. Epidemiológiai vizsgálatok

P. aeruginosa fertőzések esetén a szerzett β -laktám rezisztencia terápiás kudarchoz vezethet, különösen, amikor egyéb antibiotikumokkal szembeni rezisztenciával társul, mint az aminoglikozidok és a fluoroquinolonok. A ritkán előforduló PER (*P. aeruginosa* extended resistance)-enzim, egy kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) mely az oxyimino β -laktámokra is kiterjedő rezisztenciát okozza. A metallo β -laktamázok (MBL) a monobactam kivételével az összes β -laktámra kiterjedő rezisztenciát okozhatnak. Az MBL-gének általában a class 1 integron részei, más szintén rezisztencia-géneket tartalmazó géncsoportokkal együtt. Az MBL enzimek számos típusát azonosították *P. aeruginosa*-ban, amelyek közül a VIM-típusú enzim a legelterjedtebb.

1.1. PER-1 enzimet termelő és VIM-2 enzimet termelő *Pseudomonas aeruginosa* törzsek első magyarországi megjelenése és a törzsek jellemzése

PER-termelő *P. aeruginosa*, *A. baumannii* izolátumok és VIM-termelő *P. aeruginosa* első magyarországi észleléséről számoltunk be egy beteg kapcsán, akit egyhetes egyiptomi kórházi kezelése után szállítottak Magyarországra további kezelésre. A beteg felvételének napján tenyésztés történt égési sebeiből. A kitenyésztett baktériumok identifikálása VITEK II automatával történt, antibiotikum érzékenységük meghatározása E-teszttel. Három különböző *P. aeruginosa* törzs – egy ESBL-termelő *P. aeruginosa* (PA1), egy imipenem-rezisztens *P. aeruginosa* (PA2), egy MBL-termelő *P. aeruginosa* (PA3) került izolálásra. Mindhárom *P. aeruginosa* törzs rezisztens volt cefalosporinokra. A PA1 *P. aeruginosa* törzs érzékeny volt karbapenemekre (imipenem MIC: 2 mg/L, meropenem MIC: 0,25 mg/L), a másik *P. aeruginosa* törzs (PA2) kizárólag meropenemre volt érzékeny (imipenem MIC: 32 mg/L, meropenem MIC: 1 mg/L). Mind a PA1, mind a PA2 rezisztens volt az összes többi vizsgált – aztreonam, amikacin, netilmicin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin - antibiotikumra. A harmadik *P. aeruginosa* (PA3) törzs érzékenynek mutatkozott aztreonamra (MIC: 8 mg/L) és netilmicinre (MIC: 2 mg/L) és rezisztensnek az összes cefalosporinra és karbapenemre; EDTA jelenlétében azonban az imipenem MIC-értéke >256-ról 12 µg/ml-re csökkent, ami MBL enzim jelenlétére utalt.

A *P. aeruginosa* törzsek mellett ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae*-t (ESBL-KP), methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*-t (MRSA) és *Enterococcus faecalis*-t (EF) izoláltunk. A *K. pneumoniae* törzsnek a MIC-értékek alapján szintén ESBL fenotípusa volt és érzékeny volt karbapenemekre, amikacinra és ciprofloxacinra is. Másnap a beteg kanüljéből ESBL-termelő *A. baumannii* (ESBL-AB) és PA2 tenyésztett ki. Az *A. baumannii* izolátum rezisztens volt az összes cefalosporinra és aztreonamra, de a ceftazidim és a cefotaxim MIC-értéke csökkent klavulánsav jelenlétében, ESBL enzim jelenlétére utalva. Kórházi tartózkodása alatt az orrából PA1, ESBL-AB, ESBL-KP, MRSA, a torkából PA1, ESBL-AB, ESBL-KP, a légcsövéből PA3, ESBL-AB, ESBL-KP, MRSA és a sebéből PA1, PA3, ESBL-AB, ESBL-KP, MRSA és EF került izolálásra. Hemokultúra vételére kilenc alkalommal került sor, amelyekből szintén PA1, ESBL-KP, MRSA és EF tenyésztett ki.

A PCR vizsgálatok és a szekvenálás eredményei alapján az *A. baumannii* és *K. pneumoniae* törzsekben TEM-1 géneket sikerült azonosítanunk. OXA géneket (OXA-1 és OXA-10) a PA3 és PA1 törzsekben azonosítottunk. PER-1 géneket a PA1 és *A. baumannii* izolátumokban találtunk, míg SHV-5-öt a *K. pneumoniae* izolátumban. Csak a PA3 izolátum hordozta a VIM-2 gént. A PA3 izolátumban az OXA-10 és a VIM-2 gének egyazon class 1 típusú integronon helyezkedtek el.

Izoelektromos fókuszálást (IEF) végeztünk a törzsek által termelt béta-laktamáz enzimek izoelektromos pontjának meghatározása céljából. Az izoelektromos fókuszálás alátámasztotta a PER-1 (pI 5,3), a TEM-1 (pI 5,4), az OXA-1 (pI 7,4), az OXA-10 (pI 6,1), az SHV-5 (pI 8,2), a VIM-2 (pI 5,3) és a kromoszómális AmpC cefalosporináz (pI 8 vagy > 8,5) enzim jelenlétét a különböző törzsekben.

A törzsek eredetének vizsgálata céljából összehasonlító epidemiológiai vizsgálatot, pulsed-field gel electrophoresist (PFGE) vizsgálatot végeztünk. A három *P. aeruginosa* izolátum (PA1, PA2 és PA3) eltérő PFGE mintázatot mutatott, ami arra utalt, hogy a *P. aeruginosa* törzsek különböző klónokhoz tartoztak. Hat másik ugyanebben a magyar kórházban, azonos időben előforduló *P. aeruginosa* törzsek PFGE képével összehasonlítva a PA1, PA2 és PA3 PFGE képét nem találtunk hasonlóságot, ami a PA1, PA2 és PA3 külső eredetére utalt.

Az antibiotikum-érzékenységek, az IEF és a szekvenálási eredmények alapján igazoltuk, hogy a PA1 és az *A. baumannii* törzs PER-1 ESBL-enzimet termeltek. Az *A. baumannii* törzs TEM-1-et is termelt, a PA1 törzs pedig OXA-10 széles spektrumú β -laktamázt. A PA2 törzs kizárólag kromoszómális AmpC cefalosporinázt termelt, így a törzs imipenem rezisztenciájának hátterében külső membrán fehérje (OprD) csökkent expressziója állhatott. A PA3 törzs az OXA-1 széles spektrumú β -laktamázt és a VIM-2 MBL-enzimet termelte.

Mindemellett a PA1, PA2 és PA3 PFGE-vizsgálata megerősítette, hogy a három *P. aeruginosa* törzs – a PER-1 termelő *P. aeruginosa* (PA1), az OprD-t elvesztett *P. aeruginosa* (PA2) és a VIM-2 termelő *P. aeruginosa* (PA3) – külső eredetű volt és valószínűleg Egyiptomból hozhatták át Magyarországra/Egyiptomban fertőződött meg velük a beteg. A jó infekció-kontrollnak köszönhetően más beteg nem kolonizálódott/fertőződött meg PER-1 termelő *P. aeruginosa* törzsszel, ilyen típusú törzsek azóta sem kerültek izolálásra.

Ez az eset is felhívja a figyelmet az antibiotikum rezisztencia gének országok és földrészek közötti terjedésének lehetőségére és a külföldről érkező beteg szűrésének a fontosságára, az antibiotikum rezisztencia gének további terjedésének megakadályozása céljából.

Az eredményeket a 2007. áprilisi ECCMID kongresszuson ismertettük poszter formájában:

Szabó D, Rókusz L, Juhász Z, Szentandrassy J, Katona K, Nagy K. The first isolation of PER-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains in Hungary 17th ECCMID, München, Germany, III.31-IV.3. 2007.

Majd publikáció is készült belőle:

Szabó D, Szentandrassy J, Juhász Z, Katona K, Nagy K, Rókusz L. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. Ann Clin Microbiol Antimicrob 30;7:12, 2008.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* törzsek VIM-4 MBL-t tartalmazó class-1 integronjának megjelenése más Gram-negatív baktérium törzsekben

A metallo β -laktamáz enzimet termelő *P. aeruginosa* és *Acinetobacter* speciesek mellett, hogy fertőzések etiológiai ágenseként komoly terápiás nehézséget okoznak, potenciálisan forrásai lehetnek egyéb fajok rezisztenciájának kialakulásában. Napjainkban világszerte egyre növekvő problémát jelentenek MBL-termelő *Enterobacteriaceae* törzsek is. Az első magyarországi MBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsszel végzett vizsgálatainkkal sikerült erre bizonyítékot találnunk.

A *K. pneumoniae* KP3686 törzs 2009-ben a Semmelweis Egyetem Mikrobiológiai Laboratóriumában került izolálásra. A KP3686 törzs E-tesztel meghatározott MIC értékei alapján a széles spektrumú cephalosporinokra és ertapenemre volt rezisztens. A törzs a legtöbb nem β -laktám antibiotikummal, köztük az aminoglikozidokkal, a ciprofloxacinnal és a trimetoprim-sulfamethoxazollal szemben is rezisztenciát mutatott.

A KP3686 törzsben kromoszómálisan kódolt, nem-ESBL típusú *bla*_{SHV-11} gént és a plazmidon kódolt *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} géneket detektáltunk, ezen kívül a class-1 integronon elhelyezkedő *bla*_{VIM-4} gént. Az integron két gén kazettát hordozott: az első pozícióban egy *aac*(6')-Ib (úgynevezett *aacA4*) gént és ezt követően egy *bla*_{VIM-4} gén kazettát. A class-1 integron, a benne elhelyezkedő rezisztencia gének és a flanking régiók szekvenálási eredménye azt igazolta, hogy a VIM-4-tartalmú class-1 integron megegyezik a dél-magyarországról származó *P. aeruginosa* törzsekben és az első MBL-termelő *Aeromonas hydrophila* törzsben

korábban leírt integronnal. A nukleotid szekvencia a GenBank adatbázisába feltöltésre került és GU181265 számmal elérhető.

A KP3686 törzs két plazmidot – pKP3686/1 ~90bp, pKP3686/2 ~50 bp – tartalmazott. A class-1 integron baktériumon belüli elhelyezkedésének meghatározása céljából DNS hibridizációt végeztünk, mely kimutatta, hogy a VIM-gén a pKP3686/1 plazmidon helyezkedett el. Bár a konjugációs kísérlet nem sikerült, a β -laktamáz gént hordozó plazmidot sikerült transzformálni az *E. coli* DH5 α törzsbe. A transzformált baktériumok PCR vizsgálata és a kapott termékek szekvenálása megerősítette a *bla*_{CTX-M-15} ESBL és *bla*_{TEM-1} gének jelenlétét a pKP3686/2 plazmidon illetve a class-1 integron és a benne elhelyezkedő *bla*_{VIM-4} gén jelenlétét a pKP3686/1 plazmidon.

A PFGE és MLST vizsgálatok eredményei bizonyítják, hogy a KP3686 törzs a korábban leírt ST11 klónba tartozik, melyet CTX-M-15-termelő epidémiás klónként (EC III) országsszerte detektáltak és újabban Franciaországban, Hollandiában, Spanyolországban és Koreában is megjelent (<http://www.pasteur.fr/mlst>). Ismereteink szerint ez az első eset, hogy a nemzetközileg sikeres ST11 *K. pneumoniae* klón egy MBL-kódoló integront importált.

A class 1 gén kazetták homogenitása a *Klebsiella* spp. között és a korábban leírt *P. aeruginosa* és *Aeromonas hydrophila* között a VIM-4 rezisztencia kazetta közös eredetére utal. Bár a *bla*_{VIM}-tartalmú integronok főleg transzferábilis plazmidokkal terjednek a legtöbb bélbaktériumban, a plazmidok terjedése azonos mintázattal különböző specieshez tartozó izolátumok között, mint az általunk megfigyelt esetben, nem gyakori. Eredményeink rávilágítanak a horizontális terjedés szerepére az integron vagy plazmid terjedésében és/vagy ezek ismételt aquirálására különböző klinikai törzsekben.

Az eredményeket a következő kongresszusokon lettek ismertetve:

Kristóf Katalin, Kocsis Erika, Szabó Dóra: Néhány érdekes multirezisztens baktérium által okozott fertőzés mikrobiológiai vizsgálata. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 37. Kongresszusa. 2009. október 1-3., Szeged

Kristóf Katalin, Kocsis Erika, Szabó Dóra: Characterization of multiresistant bacterial strains in this year. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése, Keszthely, 2010. október 13-15.

A munkából a következő publikáció jelent meg:

Kristóf K, Tóth A, Damjanova I, Jánvári L, Konkoly-Thege M, Kocsis B, Koncan R, Cornaglia G, Szego E, Nagy K, Szabó D. Identification of a *bla*_{VIM-4} gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. J Antimicrob Chemother. 2010 Jun;65(6):1303-5.

2. Hazai kórházi rezisztencia viszonyok jellemzése egy súlyponti kórház modellezése során

2.1. Súlyponti kórházban izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek jellemzése

Vizsgálataink során 2006. november 1. és 2007. október 15. között Állami Egészségügyi Központ (korábbi Központi Honvédkórház) különböző osztályairól izolált *P. aeruginosa* törzseket vizsgáltuk. A vizsgálati időszak alatt 336 betegből 625 *P. aeruginosa* törzs került izolálásra. A 625 *P. aeruginosa* törzs antibiotikum érzékenységének meghatározása Mueller-Hinton táptalajon korong-diffúziós vizsgálattal történt. A törzsek MBL-termelésének szűrése korongdiffúziós vizsgálattal az ún. Combo-tesztel, illetve E-teszt segítségével történt. A

Combo teszt során a meropenem korong körül kialakuló gátlási zóna és a meropenem +EDTA korong körül kialakuló gátlási zóna nagyságának különbségéből – ha a meropenem + EDTA korong körüli gátlási zóna több mint 5 mm-rel meghaladta a meropenem körül kialakult gátlási zónát - tudtunk az MBL termelésre következtetni. E-tesztel az imipenem és imipenem+EDTA minimális gátló koncentrációját - MIC értékét - határoztuk meg. Abban az esetben, ha az imipenem illetve az imipenem+EDTA arány nyolc illetve annál nagyobb volt a törzset a fenotípusosan MBL termelőnek tartottuk.

22 beteg esetében izoláltunk fenotípusosan MBL-termelő *P. aeruginosa* törzset, illetve két esetben a fenotípusos vizsgálatok eredménye nem volt egyértelmű. Az így kiválasztott 24 törzssel további vizsgálatokat végeztünk. Multiplex PCR vizsgálatot végeztünk az MBL termelés megerősítésére. 22 esetben volt pozitív a PCR vizsgálat mely a szekvenálás eredményével együtt VIM-típusú MBL enzim jelenlétét bizonyította. Azonban abban a 2 esetben, amikor a fenotípusos teszt kétes eredményt adott az MBL-termelést PCR vizsgálattal nem tudtunk igazolni. Tíz törzsnél végeztünk izoelektromos vizsgálatot a termelt béta-laktamáz enzimek izoelektromos pontjának meghatározása céljából és mind a tíz esetben megerősítettük az VIM-típusú MBL enzim termelését, illetve egyéb béta-laktamáz enzimek jelenlétét tudtuk kimutatni: kromoszomális AmpC béta-laktamáz és OXA-típusú béta-laktamáz enzimek.

Mivel az MBL-termelés gyakran más rezisztencia mechanizmusok együttes jelenlétével van jelen, meghatároztuk az MBL termelő törzsek MIC értékeit mikrodilúciós technikával amikacin, tobramycin, gentamicin, netilmicin, és polymyxinnel szemben. A 22 törzs közül a CLSI ajánlása alapján 2 volt amikacinra, 21 tobramycinre, 22 gentamicinre, 20 netilmicinre rezisztens; és az összes törzs érzékenynek bizonyult polymyxinnel szemben. Az aminoglikozid rezisztencia molekuláris hátterét vizsgálva aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANT), aminoglycoside acetyltransferase (AAC), aminoglycoside phosphotransferase (APH) enzimek jelenlétének kimutatására PCR vizsgálatokat végeztünk. Az APH gén kimutatása egy törzsben, ANT géné 4 törzsben és az AAC géné 18 törzsben sikerült. ClassI integron jelenlétének a kimutatására PCR vizsgálatokat végeztünk és különböző méretű classI típusú integron mind a 22 törzsben kimutatható volt.

Az izolált MBL-termelő *P. aeruginosa* törzsek azonosságát többféle módszerrel vizsgáltuk. PFGE analízist végeztünk *PseI*, illetve *XbaI* restriktációs endonukleáz enzimmal történt emésztés után. Azonban a feltárás nem volt sikeres minden törzs esetében hiába alkalmaztunk azonos protokollt. Így nem tudtuk az összes törzset összehasonlítani, de a sikeresen emésztett törzsek esetében a *PseI* enzimmal történt emésztés után kapott eredmény jóval diszkriminatívabb volt, mint az *XbaI* enzimmal történt emésztés után. A célból, hogy az összes MBL termelő *P. aeruginosa* törzset összehasonlítsuk AP-PCR-t végeztünk ERIC illetve M13 primerekkel. Ez a módszer ugyan nem bizonyult olyan diszkriminatívnak, mint a hagyományos PFGE, azonban minden MBL-termelő *P. aeruginosa* törzs értékelhető eredményt mutatott. A PFGE és az AP-PCR vizsgálatok eredményeit összegezve megállapítottuk, hogy a 22 MBL-termelő *P. aeruginosa* törzs hét csoportba volt sorolható.

Az anyag a Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 2010. évi debreceni kongresszusán előadás formájában lett ismertetve:

Szentandrassy Júlia, Rókusz László, Szabó Dóra, Mlinkó Tamás, Dobák András, Nagy Károly: Metallo-béta-laktamáz termelő *Pseudomonas aeruginosa* /MBLPA/ törzsek jelenléte és szóródása egy súlyponti budapesti kórházban. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 38. kongresszusa 2010. szeptember 30 - október 2. Debrecen

2.2. Metallo-béta-laktamázt (MBL) termelő és nem termelő *Pseudomonas aeruginosa* törzsek által okozott fertőzések klinikai paramétereinek összehasonlítása

2007.07.01. és 2008.08.01. között az ÁEK-ben izolált *P. aeruginosa* törzsek által okozott fertőzéseket elemeztük. A törzsek MBL termelésének meghatározása VITEK III rendszerrel történt. A fertőzéseket retrospektív módon elemeztük a kórtörténetek áttekintésével. A demográfiai és klinikai adatokat minden egyes betegre összegyűjtöttük, beleértve a beteg nemét, korát, a kórházi osztályt, a vizsgálati mintát, egyéb betegség jelenlétét, korábbi műtétet, intenzív osztályos kezelést, a kórházi bennfekvés idejét, immunszuppresszió jelenlétét, az alkalmazott antibiotikus kezelést, idegentest jelenlétét és a fertőzés kimenetelét. A fent említett paramétereket összehasonlítottuk az MBL-pozitív és MBL-negatív betegcsoportban. Az alkalmazott statisztikai próba a khi-négyzet próba volt, ahol szükséges volt alkalmaztuk a Yates-korrekción is. A sorrendi skálán értelmezett faktoroknál a Mann-Whitney U-próbát használtuk a két minta összehasonlítására. A $P < 0,05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai számítások a STATISTICA version 9.0. szoftverrel készültek. A következő eredményeket kaptuk: nem volt szignifikáns különbség az életkor, a betegek neme, az egyéb betegség jelenléte, az intenzív osztályos kezelés, a kórházi bennfekvés ideje, immunszuppresszió jelenléte, idegentest jelenléte és a fertőzés kimenetele tekintetében az MBL-negatív és pozitív csoportok között. Azonban szignifikáns különbséget találtunk a két csoport között a kórházi osztály tekintetében ($p = 0.002$), több MBL-pozitív beteget kezeltek belgyógyászati osztályon. Szignifikánsan több hasúri mintából ($p = 0.000$) és katéterből ($p = 0.001$) került izolálásra MBL-pozitív minta. Érdekes módon az MBL-negatív betegek között szignifikánsan ($p = 0.014$) több volt a korábbi műtét. Az MBL-pozitív betegeknek pedig szignifikánsan ($p = 0.000$) több volt az ESBL-termelő baktériumok által okozott társfertőzés, mint az MBL-negatív *P. aeruginosa* által okozott fertőzéseknél. Természetesen az MBL-negatív fertőzések során a betegek szignifikánsan több béta-laktám antibiotikumot ($p = 0.000$), míg az MBL-pozitív fertőzéseknél szignifikánsan több colistint ($p = 0.000$) kaptak a betegek a kezelés során.

Az eredményeket a továbbiakban szeretnénk publikálni.

2. *Pseudomonas aeruginosa* törzsek biofilm képzése

2.1. Biofilm képzés detektálása *Pseudomonas aeruginosa* törzsekben

A klinikai mintákból egyre gyakrabban kerülnek izolálásra biofilmképző *Pseudomonas aeruginosa* (PA) törzsek, melyek között szintén egyre több a multirezisztens törzs.

Vizsgálataink során hatvan, 2008-ban az Állami Egészség Központban (ÁEK)-ban izolált *P. aeruginosa* törzsek biofilmképző tulajdonságát vizsgáltuk. Sajnos a baktériumok biofilmképzésének detektálására hivatalos ajánlás nem áll rendelkezésre, ezért több módszert, illetve értékelési formát is összehasonlítottunk. Összehasonlítottuk, hogy a biofilmképzést, illetve annak detektálását, hogyan befolyásolja az előtenyésztéshez használt táptalaj minősége, a mikroplatek aljának kialakítása (V,U,I), a festéshez használt Safranin töménysége, illetve a detektálás (spektrofotométer, vizuális) módja.

A kiválasztott baktérium törzseket Tripton Soya Broth (TSB)-ben, illetve 1M glükózzal kiegészített TSB oldatban tenyésztettük 18 órán át normál légterű termosztátban 37°C. 100x hígítást készítve a tenyészetből 200µl-t pipettáztunk 96 lyukú lemez megfelelő lyukaiba. Egy éjszakán át történt 37°C inkubálás után, mosást, illetve alkoholos fixálást követően Safranin festékoldat különböző hígításaival (0.1%-0.2%,-0.3%) festettük meg a plateket.

Az alkoholos mosást követően wellenként 50µl festékes alkoholt átmértünk egy másik plate-be és fotométerrel mértük a denzitást. A denzitási értékek azonban nagy szórást mutattak, valószínűleg azért, mert a festék egy része a műanyaghoz kötődött oldhatatlanul. Ezt a kísérletet elvégeztük mind a háromféle (V,U,II) well kialakítású mikroplate-ben elvégeztük.

A festett platek vizsgálati eredményét párhuzamosan több személy értékelte vizuálisan és az eredmények azt mutatták, hogy a lapos kiképzésű – II- well forma volt a legmegfelelőbb.

A festék különböző hígításainak összehasonlításakor szintén nagy szórások mutatkoztak az értékelést végző kollégák között a biofilmképzés megítélésében. A festék különböző hígításainak használatánál a problémát az okozta, hogy a nagyon híg festék nem festette meg a letapadt baktérium biofilm komplexet, a magasabb koncentrációban használt festék viszont már a műanyag lemezt magát is megfestette. Ezután a metodikai próbálkozásainkat abban az irányban folytattuk, hogy festetlenül értékeltük a kitapadt biofilmet. Az így végzett értékeléskor korreláltak legjobban a független személyek által végzett leolvasások.

Konklúzióként megállapítottuk, hogy glukózzal nem dúsított táptalajban történő tenyésztés és a II – lapos kiképzésű - well forma volt a legmegfelelőbb a tenyésztéshez, illetve a festés nélküli vizuális módszer volt a legoptimálisabb értékelés a biofilmképzés gyors, akár rutinszerű detektálására.

Ebből az anyagból készült előadások:

Pesti Józsefné, Kristóf Katalin, Kardos Szilvia, Szentandrassy Júlia, Szabó Dóra: Biofilmképző *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata, XI. MOLSZE Nagygyűlés, 2009. aug.27-29. Budapest

Pesti Józsefné, Kristóf Katalin, Kardos Szilvia, Szentandrassy Júlia, Szabó Dóra: Biofilmképző *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata. Magyar Eü. Szakdolgozói Kamara Budapesti Területi Szervezete IV. szakmai nap. 2010. 11. 15. Budapest

2.2. Antibiotikum kombinációk hatásának vizsgálata a biofilmképző *Pseudomonas aeruginosa* törzsekre

63 klinikai mintákból izolált *P. aeruginosa* törzs biofilmképző tulajdonságát vizsgáltuk, az előzőekben leírt módszerrel. A 63 törzs közül 14 törzs bizonyult biofilm termelőnek. A továbbiakban meghatároztuk a biofilm termelő *P. aeruginosa* törzsek minimális gátló koncentrációit (MIC) és a minimális biofilm gátló koncentrációit (MBIC) a következő antibiotikumokkal szemben: piperacillin/tazobactam, ceftazidim, cefepim, ertapenem, meropenem, imipenem, gentamicin, amikacin, tobramycin, netilmicin, ofloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, azithromycin, clarithromycin.

A vizsgált *P. aeruginosa* törzsek mind multirezisztens törzsek voltak, a vizsgált antibiotikumok közül a meropenemnek volt a legkisebb a MIC értéke az összes törzsre nézve. Összehasonlítottuk az MBIC és MIC hányadosokat a különböző biofilm termelő *P. aeruginosa* törzseknél. A clarithromycin, azithromycin és piperacillin/tazobactam esetében az MBIC érték jelentősen kisebb volt az MIC értéknél: clarithromycin esetében a törzsek 86%-ánál, azithromycin esetében a törzsek 57%-nál az MBIC/MIC hányados ≤ 0.25 ; piperacillin/tazobactam esetében: 1-1-1 (7-7-7%) törzs esetében a MBIC/MIC = $\frac{1}{4}$ -1/64-1/256; 4 törzs (28%) esetében a MBIC/MIC = 1/512; és 5 törzs esetében (35%) pedig a MBIC/MIC $\leq 1/1024$ volt.

A különböző antibiotikum kombinációk hatását a biofilm képzésre checkerboard módszerrel vizsgáltuk. Az antibiotikum kombinációk hatásosságának a biofilm képzésre vonatkozó FIC (frakcionált inhibitory concentration) index meghatározásával ítéltük meg.

A kombinációk hatását vizsgálva a biofilm képzésre fix komponensként clarithromycint használva és változó komponensként ceftazidimet, ertapenemet, cefepimet, meropenemet, imipenemet, gentamicint, amikacint, tobramycint, netilmicint, levofloxacin és ciprofloxacint használva a következő eredményeket kaptuk: A biofilmképzésre kalkulált FIC indexeket alapul véve szinergistának ($FICI \leq 0.5$) bizonyult a clarithromycin – ciprofloxacint, clarithromycin – levofloxacin kombináció a biofilm képző PA törzsek 50% illetve 75%-nál; a clarithromycin-ceftazidim kombináció a törzsek 50%-nál; a clarithromycin-amikacin kombináció a törzsek 37.5%-nál, clarithromycin-tobramycin kombináció a törzsek 67.5%-nál, clarithromycin-netilmicin kombináció a törzsek 50%-nál és a clarithromycin-gentamicin kombináció a törzsek 62.5%-nál. Érdekes módon antagonistának ($FICI > 4$) bizonyult a clarithromycin-ertapenem, clarithromycin-imipenem, clarithromycin-meropenem és a clarithromycin-cefepim kombináció a törzsek 50, 37.5, 62.5 és 75%-nál.

A makrolid antibiotikumok többféle módon is képesek a biofilm képzést gátolni, azonban fontos a kombinációs kezelések során a fellépő antagonizmussal is számolni.

Ebből az anyagból Kádár Béla TDK hallgató – témavezető dr. Szabó Dóra - a XV. Korányi Frigyes Tudományos Fórumon (2010. április 30.) a Konzervatív I. szekcióban 1. helyezést ért el.

Ebből az anyagból készült publikáció is:

Kádár B, Szász M, Kristóf K, Pesti N, Krizsán G, Szentandrassy J, Rókusz L, Nagy K, Szabó D. In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains. Acta Microbiol Immunol Hung. 2010 Sep;57(3):235-45.

3. Rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata

3.1. Mesterséges szelekcióval létrehozott *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata

A vizsgálatok során három klinikai anyagból izolált érzékeny *P. aeruginosa* két *P. aeruginosa* törzset – *P. aeruginosa* ATCC 27853 és *P. aeruginosa* PAO1- meropenem, imipenem, levofloxacin, ciprofloxacint és cefepim szelekciós nyomásának tettünk ki. A törzseket tíz napon át passzáltuk Mueller-Hinton-levesben az antibiotikumok növekvő koncentrációjával. A kisselektált rezisztens törzsek antibiotikum érzékenységet meghatározva keresztrezisztencia jelent meg különböző antibiotikum csoportok között, a meropenemmel kezelt törzs rezisztenssé vált ciprofloxacinnal és levofloxacinnal szemben is. Az efflux pumpák jelenlétét fenotípusosan megerősítettük azzal, hogy efflux pumpa gátlószer- PABN (phenyl alanine arginyl b-naphthylamide) - jelenlétében kisselektált rezisztens *P. aeruginosa* törzsek meropenem, imipenem, ciprofloxacint és levofloxacin MIC értékei jelentősen csökkentek. A továbbiakban real-time PCR vizsgálatot végeztünk, hogy meghatározzuk az efflux pumpák – MexAB-OprM és MexXY-OprM –, illetve a külső membrán fehérje – OprD expressziójának egymáshoz viszonyított mértékét (relative quantitation: r.q.) delta-delta Ct módszerrel, illetve a kialakult rezisztenciában meghatározzuk a szerepüket. „Housekeeping” génként az rpsL gént-t használtuk.

Az eredmények mutatják, hogy a meropenemmel kisselektált meropenem rezisztens *P. aeruginosa* ATCC 27853 törzs esetében az MexAB-OprM (eredeti törzs 'O' r.q.=1, kisselektált 'M' törzs r.q.= 0,88) és MexXY-OprM ('O' r.q.:1; 'M' r.q.:0,86) efflux pumpák expressziója nem változott, azonban a külső membrán fehérje expressziója ('O' r.q.:1; 'M' r.q.:0,19) jelentősen csökkent. A *P. aeruginosa* PAO1 törzs esetében a MexAB-OprM pumpa

expressziója („O” r.q.:1; „M” r.q.:5,35) jelentősen nőtt, a MexXY-OprM efflux pumpa expressziója („O” r.q.:1; „M” r.q.:0,44) és a külső membrán fehérje expressziója („O” r.q.:1; „M” r.q.:0,48) pedig csökkent. Az eredmények alapján megállapítható, hogy meropenem rezisztencia hátterében elsősorban, éppúgy mint az imipenem rezisztencia hátterében az efflux pumpák jelenléte mellett a külső membrán fehérjék csökkent expressziója is fontos szerepet játszik.

3.2. Polymixin rezisztencia vizsgálata *Pseudomonas aeruginosa* törzsekben

A polymixin E –colistin – használata napjainkban ismét egyre gyakoribb a multirezisztens baktériumok által okozott fertőzések során. A polymixin antibiotikumokkal szemben egyelőre szerencsére csak ritkán figyeltek meg rezisztenciát.

A polymixin-rezisztencia mechanizmusok még mindig nem tisztázottak teljesen. Szerepet játszhat benne az LPS-módosulás, bizonyos OMP-k csökkent termelése, illetve a külső membrán és periplazmatikus tér Ca^{2+} - és Mg^{2+} -koncentrációjának csökkenése.

A polymixin B-vel szembeni rezisztenciában kimutattak egy két kétkomponensű regulátorfehérjét, a PhoP-PhoQ-t és a PmrA-PmrB-t, melyek a Mg^{2+} -szint csökkenés hatására lépnek működésbe, és három különálló operon aktiválása révén egy olyan enzimatikus mechanizmus indítanak be, melynek eredményeképpen az LPS lipid A-jához egy aminoarabinóz molekula kapcsolódik, ami csökkenti a polymixin B kötődését az LPS-hez.

Vizsgálatunkhoz hat klinikai - 22903 S, 28593 S, 13892 HK, 28395 HK, 17898 HK, 26621 S - és két kontroll törzset ATCC 27853 és PAO1 használtunk fel. Mikrodilúciós módszerrel meghatároztuk az antibiotikum érzékenységüket különböző antibiotikumokkal szemben, illetve az antibiotikumokat pumpagátlószerrel: PABN-nel (phenyl alanine arginyl b-naphtylamide) és CCCP-vel (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine) kombinálva Táblázat 1a,b és c.

Táblázat 1A. *Pseudomonas aeruginosa* törzsek antibiotikum érzékenysége (MIC mg/L)

	TOB	TOB+PABN	TOB+CCCP	MEM	MEM+PABN	MEM+CCCP	LEV	LEV+PABN	LEV+CCCP	CIP	CIP+PABN	CIP+CCCP
22903 S	128	256	64	32	32	32	32	4	0.5	32	16	32
28593 S	256	256	256	64	64	64	32	4	0.5	32	16	32
13892 HK	256	256	64	64	0.5	16	128	0.5	4	32	0.5	32
28395 HK	0.5	0.5	64	16	16	16	8	0.5	4	4	8	2
17898 HK	128	256	128	64	64	64	64	4	64	2	8	32
26621 S	64	128	64	128	128	128	64	16	128	64	32	64
ATCC27853	1	0.5	0.5	4	2	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

TOB: tobramycin, MEM:meropenem, LEV:levofloxacin, CIP: ciprofloxacin, PABN:phenyl alanine arginyl b-naphtylamide, CCCP:carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine

Táblázat 1B. *Pseudomonas aeruginosa* törzsek antibiotikum érzékenysége (MIC mg/L)

	IPM	IPM+PABN	IPM+ CCCP	PM	PM+PABN	PM+ CCCP	CAZ	CAZ+PABN	CAZ +CCCP	GEN	GEN+PABN	GEN+CCCP
22903 S	256	256	256	256	128	64	64	32	8	256	256	256
28593 S	256	256	256	256	256	128	32	32	16	256	256	256
13892 HK	256	1	256	256	0.5	4	128	0.5	0.5	256	0.5	256
28395 HK	32	32	16	256	16	128	2	0.5	8	1	2	2
17898 HK	256	256	256	256	256	128	64	64	32	256	256	256
26621 S	256	256	256	256	256	256	256	64	64	256	256	256
ATCC 27853	64	32	64	128	4	128	2	1	1	1	0.5	0.5

IMP:imipenem, PM: cefepim, CAZ: ceftazidim, GEN: gentamicin, PABN:phenyl alanine arginyl b-naphtylamide, CCCP:carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine

Táblázat 1C. *Pseudomonas aeruginosa* törzsek antibiotikum érzékenysége (MIC mg/L)

	AMI	AMI+PABN	AMI+CCCP	NET	NET+PABN	NET+CCCP	POL B	POL B+PABN	POL B+CCCP	COL	COL+PABN	COL+CCCP
22903 S	8	8	16	4	16	8	256	256	128	256	256	256
28593 S	4	8	8	4	4	4	0.5	0.5	0.5	2	4	0.5
13892 HK	8	0.5	0.5	8	8	4	0.5	0.5	0.5	2	0.5	0.5
28395 HK	1	2	2	1	2	0.5	1	0.5	0.5	4	1	1
17898 HK	8	4	8	8	16	16	128	0.5	0.5	4	4	0.5
26621 S	4	4	8	2		4	1	0.5	0.5	8	4	4
ATCC 27853	4	1	1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	4	0.5	1

AMI: amikacin, NET: netilmicin, POLB: polymixin B, COL: colistin, PABN:phenyl alanine arginyl b-naphtylamide, CCCP:carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

A 17896 HK törzs esetében mind a PABN, mind a CCCP jelentősen csökkentette a polymixin B MIC értékét, azonban a 22903 S törzs esetében a polymixin B és colistin MIC értékek nem változtak az efflux pumpa gátlók jelenlétében. A MIC értékek alapján úgy tűnik, hogy a polymixin rezisztenciában nemcsak az efflux pumpáknak van szerepe, hanem a lipid A-nak is. A vizsgált *P. aeruginosa* törzsek lipidA szerkezetének vizsgálata az MTA Kémiai Kutatóközpont, Nanokémiai és Katalízis Intézetében dr. Szabó Pállal és a Pécsi Tudományegyetem ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében Prof. Dr. Kocsis Bélával együttműködésben fog történni.

Eddig 25 g acetonnal szárított PAO1 baktériumot sikerült termelni, ebből endotoxint kivonni és hidrolízissel lipid A-t előállítani. Ez a standard baktérium nagyon fontos összehasonlítási alapot jelent. A többi *P. aeruginosa* törzs lipidA-jának előállítása folyamatban van.